

09/856716
PCT/JP99/06615

日 本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

26.11.99

kv

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

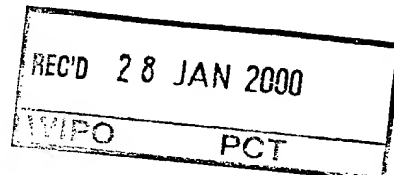
1998年11月27日

出 願 番 号
Application Number:

平成10年特許願第353926号

出 願 人
Applicant (s):

小林製薬株式会社
長岡 均



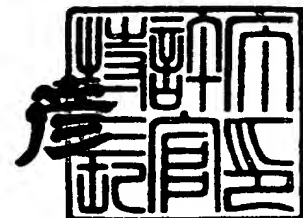
PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

BEST AVAILABLE COPY

2000年 1月 7日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤隆彦



出証番号 出証特平11-3091580

BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 982128

【提出日】 平成10年11月27日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12Q

【発明の名称】 シイタケ菌糸体抽出物を含有するLAK活性スクリーニング物質およびそれを用いたLAK活性スクリーニング法

【請求項の数】 2

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府大阪市淀川区三津屋南3-13-35 小林製薬株式会社内

【氏名】 浅野 健治

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府大阪市淀川区三津屋南3-13-35 小林製薬株式会社内

【氏名】 松田 由紀子

【発明者】

【住所又は居所】 佐賀県佐賀市八戸溝3丁目10番511号

【氏名】 田島 裕

【特許出願人】

【識別番号】 000186588

【氏名又は名称】 小林製薬株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 390041243

【氏名又は名称】 長岡 均

【代理人】

【識別番号】 100089705

【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル2

06区 ユアサハラ法律特許事務所

【弁理士】

【氏名又は名称】 社本 一夫

【電話番号】 03-3270-6641

【代理人】

【識別番号】 100071124

【弁理士】

【氏名又は名称】 今井 庄亮

【代理人】

【識別番号】 100076691

【弁理士】

【氏名又は名称】 増井 忠武

【代理人】

【識別番号】 100075236

【弁理士】

【氏名又は名称】 栗田 忠彦

【代理人】

【識別番号】 100075270

【弁理士】

【氏名又は名称】 小林 泰

【代理人】

【識別番号】 100096013

【弁理士】

【氏名又は名称】 富田 博行

【代理人】

【識別番号】 100091638

【弁理士】

【氏名又は名称】 江尻 ひろ子

特平 10 - 353926

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 051806

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9719942

【書類名】 明細書

【発明の名称】 シイタケ菌糸体抽出物を含有する LAK 活性スクリーニング物質およびそれを用いた LAK 活性スクリーニング法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 インビボにおいて LAK 活性を増強し得るかどうかをインビトロにおいてスクリーニングし得る、シイタケ菌糸体抽出物を含有する、スクリーニング物質。

【請求項 2】 以下の工程：

- (a) 末梢血を凝血防止剤と混合したのちに単核球を分離し、
- (b) 非付着性細胞を回収してリンパ球分画を得て、
- (c) リンパ球分画に請求項 1 に記載のスクリーニング物質を最終濃度 $1 \text{ ng} \sim 100 \text{ mg/ml}$ になるように加える誘導サンプルと何も加えない対照サンプルを用意して、それぞれの群を 3 日間室温において静置培養するが、その際、両サンプルに関して自然解離群、最大解離群および実験解離群を分け、
- (d) 標的細胞に $100 \sim 150 \mu\text{Ci}$ の ^{51}Cr -クロム酸ナトリウムを添加し、
- (e) 工程 (c) の最大解離群には 1 N-HCl を加え、自然解離群には何も加えず、そして実験解離群には工程 (d) で得られた標的細胞を加え、 $5\% \text{ CO}_2$ 培養器にて 37°C において 3.5 時間培養し、
- (f) 培養上清を採取して放射活性を測定し、そして、
- (g) 以下の計算式：

$$\text{LAK 活性}\% = \frac{\text{実験解離 (cpm)} - \text{自然解離 (cpm)}}{\text{最大解離 (cpm)} - \text{自然解離 (cpm)}} \times 100$$

を用いて誘導サンプルと対照サンプルの LAK 活性を算出して互いを比較することによる、LAK 活性増強スクリーニング法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、腫瘍免疫学の分野に関する。特定すれば、本発明は、抗腫瘍および

／または抗癌活性を有する免疫療法剤をスクリーニングするための物質およびその方法に関する。さらに特定すれば、本発明は、インビトロにおいてインビボにおける LAK 細胞 (Lymphokine Activated Killer Cell: リンホカイン活性化キラー細胞) の活性増強効果が得られるかどうかを判断するためのスクリーニング物質およびその方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

腫瘍免疫学における基本的概念は、腫瘍細胞が腫瘍抗原を有するということである。即ち、腫瘍細胞に特異な抗原 (TSA: Tumor Specific Antigen)、または正常細胞にもごく微量存在するが細胞の癌化に伴いその発現が増強される腫瘍関連抗原 (TAA: Tumor Associated Antigen) の存在がわかっている。このような腫瘍抗原は自己の細胞の変異に伴って生じる遺伝子自体またはその発現の変化により発現される。抗原性が異常な腫瘍細胞の治療法としては、免疫療法がもっとも一般的であり、腫瘍抗原で免疫したり、免疫機能を増強する薬剤が用いられる。一般に、腫瘍細胞を破壊する活性は正常細胞よりも NK (ナチュラルキラー) 細胞の方が高く、また NK 細胞の活性も免疫療法により増強されることが知られている。NK 細胞は正常個体中にも存在する細胞障害性リンパ系細胞であり、腫瘍細胞、ウイルス感染細胞等に対して MHC 抗原に拘束されずに障害活性を示すことが知られているが、NK 細胞でも殺傷し得ない腫瘍細胞の存在も明らかとなった。

【0003】

米国 NCI の S. Rosenberg は、リンパ球をインターロイキン 2 (IL-2) と共に培養すると、広い範囲の腫瘍細胞に細胞障害性を示す、NK 細胞でも殺傷不可能な腫瘍細胞を殺傷するキラー細胞が誘導されることを発見した (特開昭 62-116518 号参照)。このキラー細胞は LAK 細胞 (Lymphokine Activated Killer Cell: リンホカイン活性化キラー細胞) と命名された。LAK 細胞は、細胞学上は均一な集団ではなく、NK 細胞系やキラー T 細胞系の細胞集団であることが知られている。近年は、LAK 細胞を用いた養子免疫が試みられており (LAK 療法)、LAK 細胞の繰り返し投与により末期癌の縮小あるいは増殖抑制例が報

告されている。しかしながら、LAK療法の効果は個体差があり、ほとんど効果を享受できない場合もあり、苦痛を伴うLAK療法を行っても、効果が出ないことがあった。ましてIL-2によってLAK療法を行う場合、多量の白血球分離に対する肉体的負担や高濃度のIL-2投与による重篤な副作用があり、大量培養に関する経済的負担も大きい。

具体的には、IL-2を用いたLAK養子免疫療法はIL-2を単独で用いた場合よりも副作用が強く、全身倦怠、悪寒、発熱、低アルブミン、貧血、好酸球増加などの症状は必発である。さらに注目すべきは、重大ないくつかの副作用の発現にLAK細胞の正常細胞に対する傷害活性が関与している可能性が高いことで、造血幹細胞傷害による貧血や血小板現象のほか、リンパ球、マクロファージや血管内皮細胞に対するインビトロ傷害も報告されている。このようなLAK療法を行わないで、直接投与によってLAK活性を増強させ得るかどうかをインビトロにおいてスクリーニングすることができる物質の存在が望まれていた。たとえば、IL-2を用いてインビトロでスクリーニングを行なっても、不経済である上、前述のようにIL-2を直接投与した際の副作用が大きく、そのスクリーニングによって投与した後インビボで得られると思っていたLAK活性増強による効果を帳消しにしてしまうからであった。

【0004】

抗癌剤の開発においては、副作用を回避する目的で、古くから抗癌作用を有することがわかっている安全な細菌類あるいは食品等に含まれる抗癌作用物質が模索されている。例えば、細菌により癌を制圧しようとする試みは既に1900年代から始められており、セラチア菌と溶連菌の培養濾液を用いたColey'sトキシン(1964)、BCGによる白血病治療(Matthe, G., Adv. Cancer Res., 14, 1, 1971)およびモルモットにおける癌腫瘍の退縮(Zbar, B., et al., J. Natl. Cancer Inst., 48, 831, 1971)、および酵母壁多糖体の投与によるサルコーマ180等の移植癌に対する有効性等が報告されている。

【0005】

特に、多糖体に関しては、酵母グルカン、酵母マンナン、その他の菌体の多糖体、地衣類および担子菌類の多糖体における抗癌効果の追求に多大な労力が注が

れてきた。これらのうちで抗癌免疫増強薬として現在市販されているものとしては、担子菌類のサルノコシカケ科のカワラタケ培養菌糸体由来のクレスチン（呉羽化学、三共製薬：宿主の免疫機能賦活剤）およびシイタケ多糖体のレンチナン並びにスエヒロタケ多糖体などがある。また、シイタケ（*Lentinus edodes*）は日本並びに中国を代表する食用キノコであって日本では約300年も前から人工栽培が行われてきたが、その薬理効果並びに薬効成分がごく最近解明されつつあり、例えば、ラット・マウスにおける大腸および肝臓等の移植腫瘍細胞の増殖抑制効果（Sugano, N, et al., Cancer Letter, 27: 1, 1985；鈴木康将ら、日本大腸肛門病会誌、43: 178, 1990）およびマイトジェン効果（Tabata, T. et al., Immunopharmacology, 24: 57, 1992；Hibino, et al., Immunopharmacology, 28: 77, 1994）などが報告されている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明者らは、直接投与した際のインビボでのLAK活性増強効果をインビトロでスクリーニングすることができるスクリーニング物質およびその方法を提供すべく、シイタケの持つLAK活性増強効果（抗腫瘍および／または抗癌活性）に着目した。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、シイタケの食用形態である子実体の前の形態である菌糸から抽出された成分中に、子実体をはるかに凌ぐ免疫賦活活性並びに抗腫瘍および／または抗癌活性があることを見だし、しかも当該抽出物をIL-2の代替物としてインビトロにおけるいてLAK活性誘導物質として使用することにより、当該抽出物を直接投与した際のインビボにおける抗腫瘍および／または抗癌作用、特にLAK活性増強作用をスクリーニングできることを見だして、本発明を完成するに至った。

【0008】

即ち、本発明は、シイタケ菌糸体抽出物を含む抗腫瘍剤もしくは抗癌剤、特にLAK活性増強のための製剤の直接投与によるLAK活性増強効果を期待できる

か否かを、直接投与前にインビトロにおいて判断することができる、シイタケの菌糸体抽出物を含有するスクリーニング物質およびそのスクリーニング方法に関する。よって、本発明のスクリーニング物質およびスクリーニング法は、ヒトのみならず家畜にも使用可能である。

【0009】

【発明の実施の形態】

本発明による、スクリーニング物質として用いられるシイタケ菌体抽出物とは、シイタケ菌を固体培地上で培養して得られる菌糸体、好ましくは菌糸体を含む固体培地を水および酵素の存在下で粉碎、分解して得られる抽出物を言う。

【0010】

シイタケ菌糸体抽出物は、好ましくは以下の方法により得られたものを使用するが、これに限定されない。即ち、バカス（サトウキビ濃度がしぼりかす）と脱脂米糠を基材とする固体培地上にシイタケ菌を接種し、次に菌糸体を増殖させて得られる菌糸体を含む固体培地を12メッシュ通過分が30重量%以下となるように解束し、この解束された固体培地に水およびセルラーゼ、プロテアーゼまたはグルコシダーゼから選択される酵素1種またはそれ以上を30-35℃の温度に保ちながら、前記固体培地に添加すると共に、前記固体培地を前記酵素の存在下で粉碎、搗潰してバカス繊維少なくとも70重量%以上が12メッシュ通過分であるようにして、次に95℃までの温度に加熱することにより酵素を失活させると共に滅菌し、得られた懸濁状液体を濾過することによりシイタケ菌糸体抽出物を得る。シイタケ菌糸体抽出物はそのまま本発明の免疫療法剤に用いてよいが、これを濃縮、凍結乾燥して粉末として保存して、使用時に種々の形態で使用するのが便利である。凍結乾燥して得られる粉末は褐色粉末であり、吸湿性があり、特異な味と匂いを有する。

【0011】

このようにして得られるシイタケ菌糸体抽出物はフェノール-硫酸法による糖質分析により糖質を25.3%（重量/重量）、ローリー法によるタンパク質分析によりタンパク質を19.7%（重量/重量）、没食子酸を規準とするFolom-Denis法によりポリフェノールを2.6%（重量/重量）含んでいた。シイタケ

菌糸体抽出物には、その他に粗脂肪 8%、粗灰分 22%、糖質以外の可溶性無窒素物を約 20% 含んでいた。

【0012】

また、シイタケ菌糸体抽出物の構成糖組成 (5) は以下のとおりであった。

Xyl : 15.2 ; Ara : 8.2 ; Man : 8.4 ; Gul : 39.4 ; Gal : 5.4 ; GlcN : 12.0 ; GlcUA : 11.3。

【0013】

本発明のスクリーニング物質に含有されるシイタケ菌糸体抽出物は、末梢血から得られるリンパ球分画に対して直接添加することができるが、添加の前にアセトンによる無菌処理を行うことが好ましい。本発明のスクリーニング物質に含有されるシイタケ菌糸体抽出物の直接添加する際の濃度は、好ましくは 1 ng/ml ~ 100 mg/ml であり、さらに好ましくは $1 \mu\text{g/ml}$ ~ $100 \mu\text{g/ml}$ であり、特に好ましくは $10 \mu\text{g/ml}$ ~ $50 \mu\text{g/ml}$ である。

【0014】

本発明のスクリーニング剤を用いてスクリーニングを行う方法としては、高木らの方法に従い (臨床免疫、19:245-249, 1987)、IL-2 に代えてシイタケ菌糸体抽出物を含有する本発明のスクリーニング物質を用いることができる。

【0015】

即ち、本発明の LAK 活性増強スクリーニング法は、以下の工程：

- (a) 末梢血を凝血防止剤と混合したのちに単核球を分離し、
- (b) 非付着性細胞を回収してリンパ球分画を得て、
- (c) リンパ球分画に本発明のスクリーニング物質を最終濃度 1 ng ~ 100 mg/ml になるように加える誘導サンプルと何も加えない対照サンプルを用意して、それぞれの群を 3 日間室温において静置培養するが、その際、両サンプルに関して自然解離群、最大解離群および実験解離群を分け、
- (d) 標的細胞に $100 \sim 150 \mu\text{Ci}$ の ^{51}Cr -クロム酸ナトリウムを添加し、
- (e) 工程 (c) の最大解離群には 1 N-HCl を加え、自然解離群には何も加えず、そして実験解離群には工程 (d) で得られた標的細胞を加え、5% CO

2 培養器にて 37℃において 3.5 時間培養し、

(f) 培養上清を採取して放射活性を測定し、そして、

(g) 以下の計算式：

$$\text{LAK 活性 \%} = \frac{\text{実験解離 (cpm)} - \text{自然解離 (cpm)}}{\text{最大解離 (cpm)} - \text{自然解離 (cpm)}} \times 100$$

を用いて誘導サンプルと対照サンプルの LAK 活性を算出して互いを比較すること

を含む。

【0016】

本発明の好ましい態様において、各工程は以下のとおりに実施するが、適切な変更および修飾がなされてよいことは、当業者には認識される。

【0017】

工程 (a) : 被験者から採血した末梢血にヘパリンを加え、Ficoll-Conary 液 (s.g.=1.077) を用いた比重遠心分離法により界面の単核球を分離する。

【0018】

工程 (b) : 分離された単核球を PBS (pH 7.4、Ca および Mg を含まず) により 2~3 回洗浄したのち、 $1 \times 10^6 / \text{ml}$ になるように 10% FBS (非働化血清) を加えた RPMI 1640 培地 (Gibco) に懸濁する。自己血清 (血漿) を 37℃ 15 分処理してコートしたペトリ皿に移し、37℃ 1 時間培養する。非付着性細胞を回収して、リンパ球分画とする。

【0019】

工程 (c) : エフェクター細胞を 1 ウエルあたりの最終個数が $100 \mu\text{l}$ になるように濃度を調節して培養液に浮遊させる。最終培養細胞濃度が $1 \times 10^6 / \text{ml}$ を越えないようにする。該浮遊液に、シイタケ菌糸体抽出物を最終濃度 $1 \text{ ng} \sim 100 \text{ mg} / \text{ml}$ になるように加える。本発明のスクリーニング法において、シイタケ菌糸体抽出物は末梢血に対して直接添加することができるが、添加の前にアセトンによる無菌処理を行うことが好ましい。スクリーニング物質に含有されるシイタケ菌糸体抽出物の直接添加する際の濃度は、好ましくは $1 \text{ ng} / \text{ml}$

1~100mg/mlであり、さらに好ましくは1μg/ml~100μg/mlであり、特に好ましくは10μg/ml~50μg/mlである。96穴U底マイクロテストプレートにエフェクター細胞と抽出物含有培養液100μlずつを入れ、炭酸ガス培養器で培養するこの際、自然解離用と最大解離用のウエルを用意して全体がプレートの中央にまとまるようにする。自然解離用のウエルには培養液のみを200μl入れる。培養は、3日間室温において静置する。対照は何も加えない。培養細胞を再び新鮮な10%FBS添加RPMI 1640培地に懸濁する(1×10⁶/ml)。

【0020】

工程(d)：標的細胞である継代培養細胞、好ましくはDaudiあるいはRajiを遠心分離により集菌し、100~150μCiの⁵¹Cr-クロム酸ナトリウムを添加する。5%CO₂培養器にて37℃において1時間培養する。培養細胞をPBSにより3回洗浄後、1×10⁶/mlになるように10%FBS添加RPMI 1640培地に懸濁する。

【0021】

工程(e)：上記マイクロテストプレートの各ウエルについて、最大解離群には1N-HClを分注し、自然解離群(対照)には10%FBS添加RPMI 1640培地を分注し、そして実験解離群にはエフェクター細胞(50μl(1×10⁴/ウエル)ずつ)を分注する。プレート遠心分離機により800rpmにおいて5分間遠心分離して、5%CO₂培養器にて37℃において3.5時間培養する。

【0022】

工程(f)：培養したプレートからSOKEN-PET Σ-96にて各ウエルの培養上清を採取し、γシンチレーションカウンターにより放射活性を測定する。

【0023】

工程(g)：LAK活性は、以下の表に従って算出する。

$$\text{LAK活性\%} = \frac{\text{実験解離 (cpm)} - \text{自然解離 (cpm)}}{\text{最大解離 (cpm)} - \text{自然解離 (cpm)}} \times 100$$

【0024】

本発明を以下の実施例によりさらに詳細に説明するが、これらはあくまで例示であって、本発明の範囲を限定するためのものではない。本発明の精神から逸脱することなく、本発明に対する様々な変更あるいは修飾がなされてよいことは、当業者には理解される。

【0025】

【実施例】

実施例1：シイタケ菌糸体抽出物の調製

バカス90重量部、米糠10重量部からなる固体培地に純水を適度に含ませた後に、シイタケ種菌を接種し、温度および湿度を調節した培養室内に放置し、菌糸体を増殖させた。菌糸体が固体培地に密集した後、バカス基材の繊維素を解束し、12メッシュ通過分が24重量%以下となるようにした。この解束された培地1.0kgに、純水3.5lおよび精製シルラーゼ2.0gを、固体培地を40℃にた持ちながら加えて培地含有混合物とした。

【0026】

次いで、培地含有混合物を変速ギヤー付ポンプにより循環させながら、固体培地にギヤー部分において粉碎および播潰作用を200分間程度加えて、バカス繊維の約80重量%が12メッシュ通過分となるようにした。培地含有混合物の粉碎および播潰は、該混合物の温度を徐々に上昇させながら実施した。その後、培地含有混合物をさらに90℃まで加熱して酵素を失活せしめると同時に滅菌して、90℃に30分間放置した。得られた培地含有混合液を60メッシュ濾布により濾過してシイタケ菌糸体抽出物とし、濃縮した後、凍結乾燥粉末を得た。

実施例2：LAK活性の測定

被験者A、BおよびCからシイタケ菌糸体抽出物服用前の末梢血を採血した。

【0027】

被験者A、BおよびC各々に、シイタケ菌糸体抽出物1200mgを毎日3回、1週間投与した。

【0028】

被験者A、BおよびCからシイタケ菌糸体抽出物服用後に採血した。これらの末梢血にヘパリンを加え、Ficoll-Conary液(s.g.=1.077)を用いた比重遠心分

離法により界面の単核球を分離した。分離された単核球をPBS (pH 7.4、CaおよびMgを含まず) により2回洗浄したのち、 $1 \times 10^6 / \text{ml}$ になるように10% FBS (非働化血清) を加えたRPMI 1640培地 (Gibco) に懸濁した。

【0029】

標的細胞である継代培養細胞 (Daudi) を遠心分離により集菌し、 $100 \sim 150 \mu\text{Ci}$ の ^{51}Cr -クロム酸ナトリウム (New England Nuclear) を添加した。5% CO_2 培養器にて37℃において1時間培養した。培養細胞をPBSにより3回洗浄後、 $1 \times 10^6 / \text{ml}$ になるように10% FBS添加RPMI 1640培地に懸濁した。

【0030】

上記マイクロテストプレートの各ウェルについて、最大解離群には1N-HClを分注し、自然解離群 (対照) には10% FBS添加RPMI 1640培地を分注し、そして実験解離群にはエフェクター細胞 ($50 \mu\text{l}$ ($1 \times 10^4 / \text{ウェル}$) ずつ) を分注した。プレート遠心分離機により800rpmにおいて5分間遠心分離して、5% CO_2 培養器にて37℃において3.5時間培養した。

【0031】

培養したプレートからSOKEN-PET Σ -96にて各ウェルの培養上清を採取し、 γ -シンチレーションカウンターにより放射活性を測定した。

【0032】

LAK活性は以下の表に従って算出した。

$$\text{LAK活性\%} = \frac{\text{実験解離 (cpm)} - \text{自然解離 (cpm)}}{\text{最大解離 (cpm)} - \text{自然解離 (cpm)}} \times 100$$

【0033】

結果を表1並びに図1に示す。

【0034】

一方、スクリーニングするためには、被験者A、BおよびCから採血したシイタケ菌糸体抽出物服用前の末梢血にヘパリンを加え、Ficoll-Conary液 (s.g.=1

.077) を用いた比重遠心分離法により界面の単核球を分離した。分離された単核球をPBS (pH 7.4、CaおよびMgを含まず) により2回洗浄したのち、 $1 \times 10^6 / \text{ml}$ になるように10% FBS (非働化血清) を加えたRPMI 1640培地 (Gibco) に懸濁した。自己血清 (血漿) を37℃ 5分処理してコートしたペトリ皿に移し、37℃ 1時間培養した。非付着性細胞を回収して、リンパ球分画とした。

【0035】

エフェクター細胞を1ウエルあたりの最終個数が100 μ l になるように濃度を調節して培養液に浮遊させた。該浮遊液に、シイタケ菌糸体抽出物を最終濃度10 μ g/ml にて加えた。96穴U底マイクロテストプレートにエフェクター細胞と抽出物含有培養液100 μ l ずつを入れ、炭酸ガス培養器で培養した。この際、自然解離用と最大解離用のウエルを用意した。自然解離用のウエルには培養液のみを200 μ l 入れた。培養は、3日間室温において静置した。尚、対照は何も加えなかった。培養細胞を再び新鮮な10% FBS添加RPMI 1640培地に懸濁した ($1 \times 10^6 / \text{ml}$) 。

【0036】

標的細胞である継代培養細胞 (Daudi) を遠心分離により集菌し、100~150 μ Ciの⁵¹Cr-クロム酸ナトリウム (New England Nuclear) を添加した。5% CO₂培養器にて37℃において1時間培養した。培養細胞をPBSにより3回洗浄後、 $1 \times 10^6 / \text{ml}$ になるように10% FBS添加RPMI 1640培地に懸濁した。

【0037】

上記マイクロテストプレートの各ウエルについて、最大解離群には1N-HC1を分注し、自然解離群 (対照) には10% FBS添加RPMI 1640培地を分注し、そして実験解離群にはエフェクター細胞 (50 μ l ($1 \times 10^4 / \text{ウエル}$) ずつ) を分注した。プレート遠心分離機により800rpmにおいて5分間遠心分離して、5% CO₂培養器にて37℃において3.5時間培養した。

【0038】

培養したプレートからSOKEN-PET Σ -96にて各ウエルの培養上清を採取し、 γ

—シンチレーションカウンターにより放射活性を測定した。

【0039】

LAK活性は以下の表に従って算出した。

$$\text{LAK活性\%} = \frac{\text{実験解離 (cpm)} - \text{自然解離 (cpm)}}{\text{最大解離 (cpm)} - \text{自然解離 (cpm)}} \times 100$$

【0040】

この結果も合せて表1並びに図1に示す。

【0041】

【表1】

実験番号		LAK活性		
		被験者A	被験者B	被験者C
1	服用前	13%	27%	14%
2	抽出物によるスクリーニング (最終濃度: 10 μg/ml)	21%	34%	15%
3	抽出物服用後	40%	43%	15%

【0042】

【発明の効果】

被験者AおよびBにおいては、本発明のスクリーニング物質を使用したスクリーニングにおいてLAK活性の増強効果が認められたため、シイタケ菌糸体抽出物を経口投与した際のLAK活性の増強効果が期待できることが判明した。実際にシイタケ菌糸体含有物を経口投与したところ、インビボにおいてもLAK活性が増強していることが確認され、スクリーニングの妥当性を確認することができた。一方、被験者Cにおいては、本発明のスクリーニング物質を使用したスクリーニングにおいてLAK活性の増強効果が認められなかったため、シイタケ菌糸体抽出物を経口投与した際のLAK活性の増強効果は期待できないことが判明した。実際にシイタケ菌糸体含有物を経口投与したところ、インビボにおいてもLAK活性が増強していないことが確認され、スクリーニングの妥当性を確認することができた。シイタケ菌糸体抽出物を含有するスクリーニング物質を用いて、

直接投与した際のインビボでのLAK活性増強効果をインビトロでスクリーニングすることができた。

【0043】

よって、本発明のスクリーニング物質に、シイタケ菌糸体抽出物を使用することができるといえる。これにより、直接投与した際のインビボでのLAK活性増強効果を直接投与する事前にインビトロで簡便に判断することができ、LAK活性増強効果の期待できる被験者に対して、LAK活性増強物質の効果的な投与を迅速に行うことができるだけでなく、LAK活性増強効果の期待できない被験者に対しては、LAK活性増強物質の無駄な投与を防止することができる。

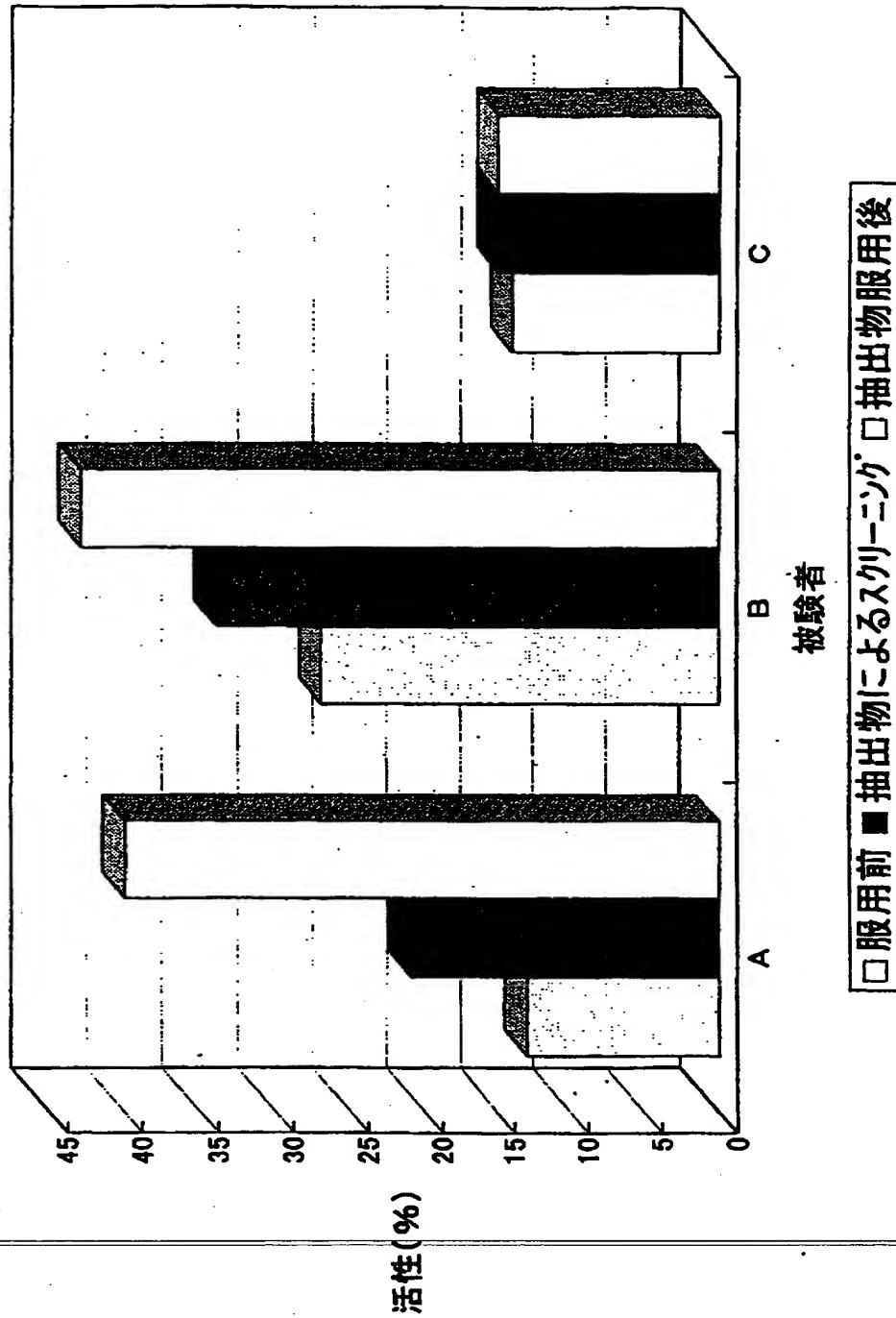
【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、本発明のシイタケ菌糸体抽出物を用いたLAK活性増強スクリーニングの結果を示す表1のデータを棒グラフにより表す。

【書類名】 図面

【図1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 安価に入手可能な抗腫瘍および／または抗癌活性を有する免疫療法剤をスクリーニングするための物質およびその方法を提供する。

【解決手段】 以下の工程：

- (a) 末梢血を凝血防止剤と混合したのちに単核球を分離し、
- (b) 非付着性細胞を回収してリンパ球分画を得て、
- (c) リンパ球分画に請求項 1 に記載のスクリーニング物質を最終濃度 1 ng ～ 100 mg/ml になるように加える誘導サンプルと何も加えない対照サンプルを用意して、それぞれの群を 3 日間室温において静置培養するが、その際、両サンプルに関して自然解離群、最大解離群および実験解離群を分け、
- (d) 標的細胞に 100～150 μ Ci の ^{51}Cr -クロム酸ナトリウムを添加し、
- (e) 工程 (c) の最大解離群には 1 N-HCl を加え、自然解離群には何も加えず、そして実験解離群には工程 (d) で得られた標的細胞を加え、5 % CO_2 培養器にて 37℃において 3.5 時間培養し、
- (f) 培養上清を採取して放射活性を測定し、そして、
- (g) 以下の計算式：

$$\text{LAK 活性 \%} = \frac{\text{実験解離 (cpm)} - \text{自然解離 (cpm)}}{\text{最大解離 (cpm)} - \text{自然解離 (cpm)}} \times 100$$

を用いて誘導サンプルと対照サンプルの LAK 活性を算出して互いを比較することによる、LAK 活性増強スクリーニング法を用いる。

【選択図】 図 1

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000186588
【住所又は居所】 大阪府大阪市中心区道修町4丁目3番6号
【氏名又は名称】 小林製薬株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 390041243
【住所又は居所】 千葉県我孫子市寿2丁目22番13号
【氏名又は名称】 長岡 均

【代理人】

申請人
【識別番号】 100089705
【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所
【氏名又は名称】 社本 一夫

【代理人】

申請人
【識別番号】 100071124
【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所
【氏名又は名称】 今井 庄亮

【代理人】

申請人
【識別番号】 100076691
【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所
【氏名又は名称】 増井 忠式

【代理人】

申請人
【識別番号】 100075236
【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所
【氏名又は名称】 栗田 忠彦

【代理人】

申請人
【識別番号】 100075270
【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所
【氏名又は名称】 小林 泰

【代理人】

申請人
【識別番号】 100096013

【住所又は居所】	東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所
【氏名又は名称】	富田 博行
【代理人】	申請人
【識別番号】	100091638
【住所又は居所】	東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所
【氏名又は名称】	江尻 ひろ子

特平10-353926

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000186588]

1. 変更年月日

1990年 8月20日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市中央区道修町4丁目3番6号

氏 名

小林製薬株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [390041243]

1. 変更年月日 1990年12月14日

[変更理由] 新規登録

住 所 千葉県我孫子市寿2丁目22番13号

氏 名 長岡 均

BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)